

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
10 mai 2007 (10.05.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2007/051923 A2

(51) Classification internationale des brevets :  
C07K 2/00 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)  
C08G 69/10 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2006/002443

(22) Date de dépôt international :  
31 octobre 2006 (31.10.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0553302 31 octobre 2005 (31.10.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33 Avenue  
Georges Lévy, Parc Club Du Moulin À Vent, F-69200  
Venissieux (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : SOULA,  
Olivier [FR/FR]; 115 avenue du Carreau, 69330 Meyzieu  
(FR). SOULA, Rémi [FR/FR]; 22 rue Bouteille, F-69001  
Lyon (FR). BREYNE, Olivier [FR/FR]; 5 rue Rosset,  
F-69004 Lyon (FR).

(74) Mandataires : CABINET PLASSERAUD etc.; 52 rue de  
la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,  
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,  
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: POLYGLUTAMIC ACIDS FUNCTIONALISED BY HISTIDINE DERIVATIVES AND HYDROPHOBIC GROUPS  
AND THE USES THEREOF IN PARTICULAR FOR THERAPEUTIC PURPOSES

(54) Titre : ACIDES POLYGLUTAMIQUES FONCTIONNALISÉS PAR DES DERIVES DE L'HISTIDINE ET DES GROUPE-  
MENTS HYDROPHOBES ET LEURS APPLICATIONS NOTAMMENT THERAPEUTIQUES

(57) Abstract: The invention relates to novel biodegradable materials based on modified polyomino acids and suitable, in particu-  
lar, for vectoring active substance(s) (AS). Said invention also relates to novel pharmaceutical, cosmetic, dietary or plant protective  
compositions which are based on said polyamino acids. The aim of said invention is to provide a novel polymer raw material usable  
for vectoring the AS and capable to optimally meet all specification in this area: biocompatibility, biodegradability, ability to become  
easily associated with many active substances or to solubilise them and to release said active substances in vivo. The aim is attained  
by the invention which relates to novel polyglutamates modified by histidine derivatives and hydrophobic groups containing from 8  
to 30 carbon atoms. Said polyglutamates modified by histidine derivatives are soluble with pH lower than 5 and are easily and eco-  
nomically convertible into active substance vectorisation particles which are able to form stable aqueous colloidal suspensions. On  
the contrary, said modified polyglutamates are insoluble in water with a physiological pH (7, 4), and thereby have to be precipitated  
on an injection site in the case of a subcutaneous injection.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des nouveaux matériaux à base de polyaminoacides modifiés, biodégradables, utiles  
notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA). L'invention vise aussi de nouvelles compositions pharmaceutiques,  
cosmétiques, diététiques ou phytosanitaires à base de ces polyaminoacides. Le but de l'invention est de fournir une nouvelle matière  
première polymère, susceptible d'être utilisée pour la vectorisation de PA et permettant de satisfaire de manière optimale à toutes les  
spécifications requises en l'espèce : biocompatibilité, biodégradabilité, aptitude à s'associer facilement avec de nombreux principes  
actifs ou à les solubiliser, et à libérer ces principes actifs in vivo. Ce but est atteint par la présente invention qui concerne des  
nouveaux polyglutamates modifiés par des dérivés de l'histidine, et par des groupements hydrophobes comportant de 8 à 30 atomes  
de carbone. Ces polyglutamates modifiés par des dérivés de l'histidine sont solubles à pH inférieur à 5 et sont aptes à se transformer  
aisément et économiquement en particules de vectorisation de principes actifs, ces particules étant elles même propres à former des  
suspensions colloïdales aqueuses stables. Ces polyglutamates modifiés sont en revanche insolubles dans l'eau à pH physiologique  
(7,4) et devraient donc, lors d'une injection sous-cutanée, précipiter sur le site d'injection.

WO 2007/051923 A2

**ACIDES POLYGLUTAMIQUES FONCTIONNALISES PAR DES DERIVES DE  
L'HISTIDINE ET DES GROUPEMENTS HYDROPHOBES ET LEURS  
APPLICATIONS NOTAMMENT THERAPEUTIQUES**

5 La présente invention concerne des nouveaux matériaux biodégradables à base de copolyaminoacides, utiles notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA). L'invention vise aussi de nouvelles compositions pharmaceutiques, cosmétiques, diététiques ou phytosanitaires à base de ces polyaminoacides modifiés. Ces compositions peuvent être du type de celles permettant la vectorisation de PA et se présentant, de  
10 préférence, sous forme d'émulsions, de micelles, de particules, de gels, d'implants ou de films.

Les PA considérés sont, avantageusement, des composés biologiquement actifs et qui peuvent être administrés à un organisme animal ou humain par voie orale, parentérale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique,  
15 intrapéritonéale, intracérébrale, buccale, etc.

Les PA plus particulièrement, mais non limitativement, concernés par l'invention sont des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligo ou des polynucléotides, et des molécules organiques. Mais il peut aussi s'agir de produits cosmétiques ou de produits phytosanitaires, tels que des herbicides, des  
20 insecticides, des fongicides, etc.

Dans le domaine de la vectorisation des principes actifs notamment médicamenteux, il existe un besoin, dans beaucoup de cas :

- de les protéger contre la dégradation (hydrolyse, digestion enzymatique  
25 etc..),
- et/ou de contrôler leur vitesse de libération afin de maintenir un niveau thérapeutique sur une durée définie,
- et/ou de les véhiculer (en les protégeant) au site d'action.

30 A ces fins, plusieurs types de polymères ont été étudiés et certains sont même disponibles commercialement. On peut citer, par exemple, les polymères du type polylactique, polylactique-glycolique, polyoxyéthylène-oxypropylène, polyaminoacide ou encore polysaccharide. Ces polymères constituent des matières premières permettant de fabriquer, par exemple, des implants massiques, des microparticules, des nanoparticules, des  
35 vésicules, des micelles ou des gels. Outre le fait que ces polymères doivent être adaptés à la fabrication de tels systèmes, ils doivent également être biocompatibles, non-toxiques, non-immunogènes, économiques et ils doivent pouvoir être facilement éliminés du corps

et/ou être biodégradables. Sur ce dernier aspect, il est de surcroît essentiel que la biodégradation dans l'organisme génère des produits non-toxiques.

A titre d'illustration de l'art antérieur concernant des polymères employés comme matières  
5 premières pour la réalisation de systèmes de vectorisation de PA, divers brevets ou demandes de brevet ou articles scientifiques sont évoqués ci-après.

Le brevet US-B-4,652,441 décrit des microcapsules de polylactide encapsulant l'hormone LH-RH. Ces microcapsules sont produites en préparant une émulsion eau-dans-huile-dans-  
10 eau et comprennent une couche interne aqueuse contenant l'hormone, une substance (gélatine) fixant cette dernière, une couche huileuse de polylactide, ainsi qu'une couche externe aqueuse (alcool polyvinylique). La libération du PA peut se faire sur une période de plus de deux semaines après injection sous-cutanée.

15 Le brevet US-B-6,153,193 décrit des compositions à base de micelles de poly(oxyéthylène)-poly(oxypropylène) amphiphiles, pour la vectorisation d'anti-cancéreux tel que l'adriamycine.

Akiyoshi et al. (J. Controlled Release 1998, 54, 313-320) décrivent des pullulans qui sont  
20 rendus hydrophobes par greffage de cholestérol et qui forment des nanoparticules dans l'eau. Ces nanoparticules aptes à se complexer de manière réversible avec l'insuline, forment des suspensions colloïdales stables.

Le brevet US-B-4,351,337 décrit des copolyaminoacides amphiphiles, à base de leucine et  
25 de glutamate, utilisables sous forme d'implants ou de microparticules pour la libération contrôlée de principes actifs. La libération de ces derniers peut se faire sur une durée très longue dépendant de la vitesse de dégradation du polymère.

Le brevet US-B-4,888,398 décrit des polymères à base de polyglutamate ou polyaspartate,  
30 et éventuellement polyleucine, avec des groupements pendants de type alkyloxycarbonylméthyle, placés de façon aléatoire sur la chaîne polyaminoacide. Ces polyaminoacides, greffés par des groupements latéraux e.g. méthoxycarbonylméthyle, sont utilisables sous forme d'implants biodégradables contenant un PA à libération prolongée.

35 Le brevet US-B-5,904,936 décrit des nanoparticules obtenues à partir d'un polymère bloc polyleucine-polyglutamate, aptes à former des suspensions colloïdales stables et capables de s'associer spontanément avec des protéines biologiquement actives sans les dénaturer.

Ces dernières peuvent ensuite être libérées *in vivo* de manière contrôlée, sur une longue période.

5 Le brevet US-B-5,449,513 décrit des copolymères bloc amphiphiles comprenant un bloc polyoxyéthylène et un bloc polyaminoacide, par exemple poly(béta-benzyl-L-aspartate). Ces polymères polyoxyéthylène-polybenzylaspartate forment des micelles qui sont aptes à encapsuler des molécules actives hydrophobes telles que l'adryamicine ou l'indométhacine.

10 La demande de brevet WO-A-99/61512 décrit des polylysines et des polyornithines fonctionnalisées par un groupe hydrophobe (acide palmitique relié à la polylysine ou ornithine) et un groupe hydrophile (polyoxyéthylène). Ces polymères, par exemple la polylysine greffée avec des chaînes polyoxyéthylène et palmitoyl forment, en présence de cholestérol, des vésicules capables d'encapsuler la doxorubicine ou l'ADN. Ces polymères  
15 à base de polylysines sont cationiques en milieu physiologique.

Le brevet US-B-6,630,171 de la demanderesse, décrit des polymères blocs ou aléatoires poly(glutamate de sodium)-poly(glutamate de méthyle, d'éthyle, d'hexadécyle ou de dodécyle), aptes à former des suspensions colloïdales stables et capables de s'associer  
20 spontanément avec des protéines biologiquement actives sans les dénaturer. Ces dernières peuvent ensuite être libérées *in vivo* de manière contrôlée, sur une longue période. Ces copolyaminoacides linéaires amphiphiles sont modifiés par la présence d'une chaîne latérale alkyle hydrophobe. Ces groupements alkyles sont greffés de façon covalente sur le polymère via une fonction ester. Ces polymères sont anioniques en milieu physiologique.

25

Dans le même domaine, la demanderesse a décrit dans plusieurs demandes de brevets, des polymères à base de polyglutamate (anioniques) avec des concepts apparentés.

La demande WO-A-03/104303 décrit des polyaminoacides anioniques fonctionnalisés par  
30 de l'alpha-tocophérol.

La demande WO-A-2004/013206 décrit des polyaminoacides anioniques comportant des groupements hydrophobes et caractérisés en ce que ces groupements sont reliés au polymère par l'intermédiaire d'une rotule contenant deux fonctions amides, et plus  
35 précisément via un espaceur de type lysine ou ornithine.

La demande WO-A-2004/060968 décrit des polyaminoacides fonctionnalisés par au moins un groupement oligoaminoacide à base de leucine et/ou isoleucine et/ou valine et/ou phénylalanine.

- 5 L'article de W. C. Shen. Acid-sensitive dissociation between poly(lysine) and histamine-modified poly(glutamate) as a model for drug-releasing from carriers in endosomes. *Biochim Biophys Acta* 1034 (1):122-124, 1990, décrit un polyglutamate fonctionnalisé par 40% d'histamine. Cependant, aucun squelette polyglutamate hydrophobisé n'est décrit. De plus, le polymère développé précipite entre pH 4 et 5 et est soluble à pH physiologique.
- 10 Seule l'application visant à former des complexes avec un polylysine sensible au pH est développée. Ces complexes sont basés sur des interactions électrostatiques. En effet, à pH physiologique, le complexe polyglutamate-histamine-polylysine est formé alors qu'il se décompose à pH 4-5, valeur du pH dans l'endosome.
- 15 Plus récemment, Kim *et al.* ont décrit des polyaspartates modifiés par des dérivés de l'imidazole et porteurs d'amines grasses (C18NH<sub>2</sub>), Controlled Release Society, 32th annual meeting, Miami, juin 2005, #254 et #361. Tout d'abord ces polymères sont basés sur des polyaspartates composés d'un mélange de forme alpha et bêta. De plus, dans la communication #254, l'histidine est greffée par la fonction acide ce qui conduit à obtenir
- 20 un polymère présentant des amines en groupement pendant et donc à obtenir un polymère cationique et soluble à pH physiologique. Dans la communication #361, le greffon n'est pas un dérivé de l'histidine mais un dérivé de l'imidazole, le 1-(3-aminopropylimidazole). Quelques articles décrivent des polylysines fonctionnalisés par des dérivés de l'histidine. L'article de M. Bikram et al. Biodegradable Poly(ethylene glycol) -co-poly(L-lysine)-g-
- 25 histidine Multiblock Copolymers for Nonviral Gene Delivery. *Macromolecules* 37:1903-1916, 2004 décrit le couplage de la N-diméthylhistidine sur un co-polyéthylèneglycol-polylysine par les amines pendantes de la lysine. Ces polymères sont employés dans des stratégies de thérapies géniques et servent donc à associer de l'ADN. Le rôle de l'histidine est de favoriser la transfection dans la cellule, cet acide aminé étant cationique dans
- 30 l'endosome. La séparation polymère/ADN est donc facilitée par répulsion électrostatique dans l'endosome. Ces polymères sont cationiques à pH neutre.

Ainsi, même si de très nombreuses solutions techniques sont développées et proposées dans l'art antérieur pour la vectorisation des principes actifs médicamenteux, la réponse à

35 l'ensemble des exigences est difficile à obtenir et demeure perfectible. Plus spécifiquement, l'invention concerne des polyaminoacides biodégradables, transformables en nano- ou micro-particules colloïdales de vectorisation aptes à s'associer réversiblement à des principes actifs.

Dans ce contexte, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est de fournir de nouveaux copolyaminoacides amphiphiles, linéaires ou branchés, dont la solubilité en phase aqueuse est dépendante du pH. Il est intéressant de développer des polymères solubles à pH acide ( $\text{pH} < 6$ ) et insolubles à pH physiologique ( $\text{pH} = 7.4$ ). Ces polymères  
5 représentent un perfectionnement par rapport à ceux décrits dans les brevets ou demandes de brevets cités plus haut en termes de vectorisation d'un principe actif tel qu'une protéine thérapeutique.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est que ces polymères soient aptes à  
10 être utilisés pour la vectorisation de PA et permettent de satisfaire de manière optimale à toutes les spécifications du cahier des charges, à savoir notamment :

- capacité :
  - à former aisément et économiquement des suspensions colloïdales aqueuses stables,
  - 15 ▪ à s'associer facilement avec de nombreux principes actifs,
  - et à libérer ces principes actifs in vivo,
- biocompatibilité,
- biodégradabilité,
- stabilité à l'hydrolyse.

20

Cet objectif, parmi d'autres, est atteint par la présente invention qui concerne des polyaminoacides comprenant des unités glutamiques, caractérisés en ce qu'au moins une partie de ces unités sont porteuses d'un dérivé de l'histidine et en ce qu'au moins une partie de ces unités sont porteuses d'un groupement hydrophobe (GH) pendant, les dérivés  
25 de l'histidine et les GH étant respectivement identiques ou différents entre eux.

Chaque polyglutamate selon l'invention est donc fonctionnalisé par une multiplicité de dérivés de l'histidine et de groupements hydrophobes (GH), pendants et identiques ou différents entre eux.

30

Au sens de l'invention, le terme "multiplicité" signifie que le polyglutamate est fonctionnalisé par :

- \* au moins 1 % de dérivés de l'histidine (% molaire par rapport aux acides glutamiques) et jusqu'à 99%,
- 35 \* en moyenne, au moins deux GH pendants par molécule. Il est possible conformément à l'invention que le polyacide glutamique présente, en plus des GH pendants, des GH fixés sur au moins l'une des extrémités des chaînes de copolymère.

De préférence, pour au moins une des parties des unités glutamiques porteuses d'un dérivé de l'histidine, chaque unité de ladite partie est porteuse d'un dérivé de l'histidine, les dérivés de l'histidine étant identiques ou différents entre eux, et pour au moins une des parties des unités glutamiques porteuses d'un groupement hydrophobe (GH) pendant, chaque unité de ladite partie est porteuse d'un groupement hydrophobe (GH) pendant, les groupements GH étant identiques ou différents entre eux.

De préférence, les dérivés de l'histidine sont pendants par rapport aux unités glutamiques. Au sens de l'invention, l'expression « être porteur » signifie que le groupement porté est pendant, c'est-à-dire que ledit groupement est un groupement latéral par rapport aux unités glutamiques et est un substituant de la fonction carbonyle en  $\epsilon$  de l'unité glutamique qui le porte.

Suivant une modalité préférée de l'invention, le polyglutamate comporte en moyenne au moins 3 groupements hydrophobes (GH) par chaîne copolymère.

Le polyglutamate est également porteur de dérivés de l'histidine. Ces groupements sont, de préférence, liés au copolymère par l'intermédiaire d'une liaison amide.

Il est du mérite de la demanderesse d'avoir mis au point une nouvelle famille de polymères à base de polyglutamate et de dérivés de l'histidine « sensible au pH », insoluble à pH physiologique et fonctionnalisés par une multiplicité de groupements hydrophobes et aptes à former des systèmes colloïdaux stables. La capacité de modifier la solubilité du polymère en fonction du pH peut s'avérer très efficace pour l'extension du temps de libération. Les polymères type PLAGA, également insolubles dans les conditions physiologiques permettent d'obtenir des durées de libération longues. L'avantage du système présenté tient à sa biodégradabilité.

Ces nouveaux polymères se sont avérés être particulièrement bien adaptés pour la vectorisation des protéines. De plus, ils sont facilement dégradés, en présence d'enzymes, en catabolites/métabolites non toxiques (acides aminés).

Au sens de l'invention et dans tout le présent exposé, les termes "association" ou "associer" employés pour qualifier les relations entre un ou plusieurs principes actifs et les polyglutamates modifiés, signifient, en particulier, que le ou les principes actifs sont liés au(x) polyglutamate(s) notamment par une interaction hydrophobe, et/ou sont encapsulés par le ou les polyglutamates.

Avantageusement, les polyaminoacides selon l'invention sont, e.g., des homopolymères d'alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-glutamique.

Les dérivés d'histidine utilisables pour fonctionnaliser les unités glutamates sont  
5 identiques ou différents entre eux et correspondent à un éthyle substitué en position 1 par une amine et en position 2 par un noyau imidazole. D'autres substituants peuvent être présents sur ces deux positions. Ces dérivés peuvent être par exemple : les esters d'histidine (tels que l'ester méthylique et l'ester éthylique), l'histidinol et l'histamine. Ces dérivés peuvent être également par exemple l'histidinamide, le dérivé N-  
10 monométhyle de l'histidinamide et le dérivé N,N'-diméthyle de l'histidinamide.

Suivant une caractéristique préférée, les polyaminoacides de l'invention comportent en moyenne au moins 3 groupements hydrophobes (GH) par chaîne de polymère.

15 Avantageusement, au moins l'un des groupements hydrophobes GH est inclus dans un greffon hydrophobe comprenant au moins une rotule (ou motif) d'espacement ("spacer") permettant de relier le groupement hydrophobe GH à une chaîne de polyglutamate (par exemple une chaîne principale – squelette-polyglutamate). Cette rotule peut comprendre, e.g. au moins une liaison covalente directe et/ou au moins une liaison amide et/ou au  
20 moins une liaison ester. Par exemple, la rotule peut être du type de celles appartenant au groupe comportant notamment: les unités "acide aminé" différentes de l'unité monomérique constitutive du polyglutamate, les dérivés des aminoalcools, les dérivés des polyamines (par exemple les diamines), les dérivés des polyols (par exemple les diols) et les dérivés des hydroxyacides.

25

Le greffage des GH sur la chaîne polyglutamate peut passer par la mise en œuvre de précurseurs de GH, aptes à se lier à la chaîne polyglutamate.

Les précurseurs des GH sont, en pratique et sans que cela ne soit limitatif, choisis dans le  
30 groupe comprenant les alcools et les amines, ces composés pouvant être fonctionnalisés facilement par l'homme de l'art. Le greffage des GH est explicité plus en détails ci-après dans la description du procédé d'obtention des polyaminoacides modifiés selon l'invention.

Suivant une caractéristique préférée, le groupement hydrophobe GH du greffon  
35 hydrophobe comporte de 8 à 30 atomes de carbone.

Ces groupements hydrophobes GH sont avantageusement et judicieusement sélectionnés dans le groupe comprenant :



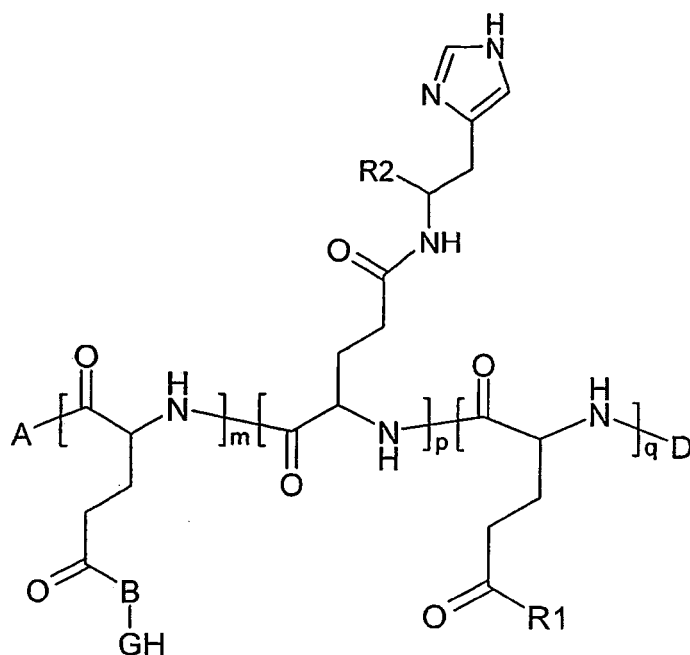
- les alkyles linéaires ou ramifiés en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome,
- les alkylaryles ou arylalkyles en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome,
- 5 • et les (poly)cycliques en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome.

Les rotules formant avec les GH des greffons hydrophobes, peuvent être di-, tri- ou tétravalentes (voire pentavalentes et plus). Dans le cas d'une rotule divalente, le greffon  
10 hydrophobe comporte un seul groupement GH, tandis qu'une rotule trivalente confère au greffon hydrophobe un caractère bifide, c'est à dire que le greffon présente deux "pattes" GH. A titre d'exemple de rotule trivalente on peut citer, entre autres, des unités "acide aminé", par exemple "acide glutamique" ou des restes polyols, par exemple glycérol. Ainsi, deux exemples avantageux mais non limitatifs de greffons hydrophobes comprenant  
15 des GH bifides sont les dialkyles glycérol et les dialkyles glutamate.

Les groupements hydrophobes GH peuvent être, par exemple, dérivés de groupements choisis dans le groupe comprenant :  
l'octanol, le dodécanol, le tétradécanol, l'héxadécanol, l'octadécanol, l'oleylalcool, le  
20 tocophérol ou le cholestérol.

De préférence, le squelette du polyglutamate selon la présente invention comprend des unités d'alpha-L-glutamate et/ou d'alpha-L-glutamique acide.

- 25 De manière plus préférée encore, les polyglutamates selon l'invention répondent à l'une des formules générales (I) suivantes:



I

5 dans laquelle :

- A représente indépendamment :
  - Un groupement NHR dans laquelle R représente un H, un alkyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10 ou un benzyle,
  - Une unité acide aminé terminale liée par l'azote et dont la fonction(s) acide(s) est éventuellement modifiée par une amine ou un alcool répondant aux définitions NHR et OR respectivement.
- B est un groupement de liaison divalent, trivalent ou tétravalent, de préférence choisi parmi les radicaux suivants:
  - O-, -NH-, -N-alkyle- (C1 à C5), un résidu d'acide aminé (de préférence naturel), un diol, un triol, une diamine, une triamine, un aminoalcool ou un hydroxyacide comportant de 1 à 6 atomes de carbone,
- D représente un H, un groupe acyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, ou un pyroglutamate;
- Les groupements hydrophobes GH représentent chacun indépendamment les uns des autres un radical choisi parmi:
  - Les alkyles linéaires ou ramifiés en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S), ou

- Les alkylaryles ou arylalkyle en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S), ou
  - Les (poly)cycliques en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S);
- R1 représente l'éthanol amine liée par l'amine, un radical OX, dans lequel X représente un H ou une entité cationique, de préférence sélectionnée dans le groupe comprenant :
  - les cations métalliques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant : le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium ;
  - les cations organiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant :
    - les cations à base d'amine,
    - les cations à base d'oligoamine,
    - les cations à base de polyamine (la polyéthylèneimine étant particulièrement préférée),
    - les cations à base d'acide(s) aminé(s) avantageusement choisis dans la classe comprenant les cations à base de lysine ou d'arginine,
  - ou les polyaminoacides cationiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant la polylysine ou l'oligolysine;
- R2 représente un ester d'alkyl, d'éthyle de préférence, un ester de BGH, un groupe  $\text{CH}_2\text{OH}$  (histidinol), H (histamine), un groupe  $\text{C(O)NH}_2$  (histidinamide),  $\text{C(O)NHCH}_3$  ou  $\text{C(O)N(CH}_3)_2$ .
- m, p et q sont des entiers positifs;
- $(m)/(m+p+q)$  est défini comme le taux de greffage molaire des groupements hydrophobes GH et varie de 1 à 50 % molaire sous condition que chaque chaîne de copolymère possède en moyenne au moins 3 greffons hydrophobes;
- $(p)/(m+p+q)$  est défini comme le taux de greffage molaire des groupements histidines et varie de 1 à 99 % molaire.
- $(m+p+q)$  varie de 10 à 1000, de préférence entre 30 et 500;
- $(q)/(m+p+q)$  varie de 0 à 98 % molaire.

De préférence, les groupements hydrophobes GH sont disposés de façon aléatoire.

Il est par ailleurs préférable que le taux de greffage molaire en motif hydrophobe des polyglutamates selon l'invention, soit compris entre 2 et 100 %, et de préférence entre 5 et 50 % sous condition que chaque chaîne de polymère possède en moyenne au moins 3 greffons hydrophobes.

5

Le rapport  $(p)/(m+p+q)$  des polyglutamates selon l'invention signifie qu'ils peuvent contenir de 1 à environ 99 % molaire de groupements contenant un noyau imidazole.

De préférence, les polyaminoacides tels que décrits ci-dessus sont capables de précipiter à pH physiologique.

10

Le rapport  $(q)/(m+p+q)$  des polyglutamates selon l'invention signifie qu'ils peuvent contenir de 0 à environ 98 % molaire de fonctions carboxyliques, carboxylates ou hydroxy ethylglutamine.

15

Selon une autre caractéristique remarquable de l'invention, les polymères selon l'invention ont une masse molaire qui se situe entre 2.000 et 200.000 g/mole, et de préférence entre 5.000 et 100 000 g/mole.

Suivant une variante, les polyglutamates selon l'invention peuvent être porteurs d'au moins un greffon de type polyalkylène (de préférence éthylène)glycol lié à une unité glutamate.

20

Naturellement, l'invention couvre également des mélanges de polyaminoacides modifiés tels que définis ci-dessus.

25

De manière remarquable, les polyglutamates de l'invention sont susceptibles d'être utilisés de plusieurs façons selon la nature des groupements hydrophobes et le degré de polymérisation du polyglutamate. Les méthodes de mise en forme d'un polymère pour l'encapsulation d'un principe actif sous les diverses formes visées par l'invention sont connues de l'homme de l'art. Pour plus de détails, on peut se référer, par exemple à ces quelques références particulièrement pertinentes :

30

*"Microspheres, Microcapsules and Liposomes ; vol 1. Preparation and chemical applications"* Ed. R. Arshady, Citus Books 1999. ISBN : 0-9532187-1-6.

*"Sustained-Release Injectable Products"* Ed. J. Senior et M. Radomsky, Interpharm Press 2000. ISBN : 1-57491-101-5.

35

*"Colloidal Drug Delivery Systems"* Ed. J. Kreuter, Marcel Dekker, Inc. 1994. ISBN : 0-8247-9214-9.

"*Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*" Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, Inc. 2000. ISBN : 0-8247-0369-3.

Ces polyglutamates modifiés par des dérivés histidine sont en outre extrêmement  
5 intéressants du fait qu'ils se dispersent dans l'eau à pH inférieur à 5 (par exemple en  
présence d'acide) pour donner des solutions ou des suspensions colloïdales et qu'ils  
précipitent à pH physiologique (7,4) soit par ajout d'une base, soit par dispersion dans une  
solution à pH neutre. Une précipitation doit donc vraisemblablement se produire sur le site  
10 d'injection, lors d'une injection sous-cutanée. De plus, ces polyglutamates (sous forme de  
particules ou non), peuvent encapsuler ou associer aisément des principes actifs tels que  
des protéines, peptides ou petites molécules. La mise en forme préférée est celle décrite  
dans le brevet US-B-6,630,171 de la demanderesse et qui consiste à disperser le  
copolymère dans l'eau et à incuber la solution en présence d'un principe actif (PA). Cette  
15 solution colloïdale de particules de vectorisation constituées des polyglutamates selon  
l'invention, peut ensuite être filtrée sous 0,2  $\mu\text{m}$  puis directement injectée à un patient.

Indépendamment du fait que la forme microparticulaire du polymère selon l'invention est  
préférée, les copolymères de l'invention, sous forme neutre ou ionisée, sont de façon plus  
générale, utilisables seuls ou dans une composition liquide, solide ou gel et dans un milieu  
20 aqueux ou organique.

Il convient de comprendre que les fonctions résiduelles carboxyliques du polyglutamate  
modifié sont soit neutres (forme  $\text{COOH}$ ), soit ionisées (anion  $\text{COO}^-$ ), selon le pH et la  
composition. En solution aqueuse, le contre-cation peut être un cation métallique tel que le  
25 sodium, le calcium ou le magnésium, ou un cation organique tel que la triéthanolamine, la  
tris(hydroxyméthyl)-aminométhane ou une polyamine tel que la polyéthylèneimine.

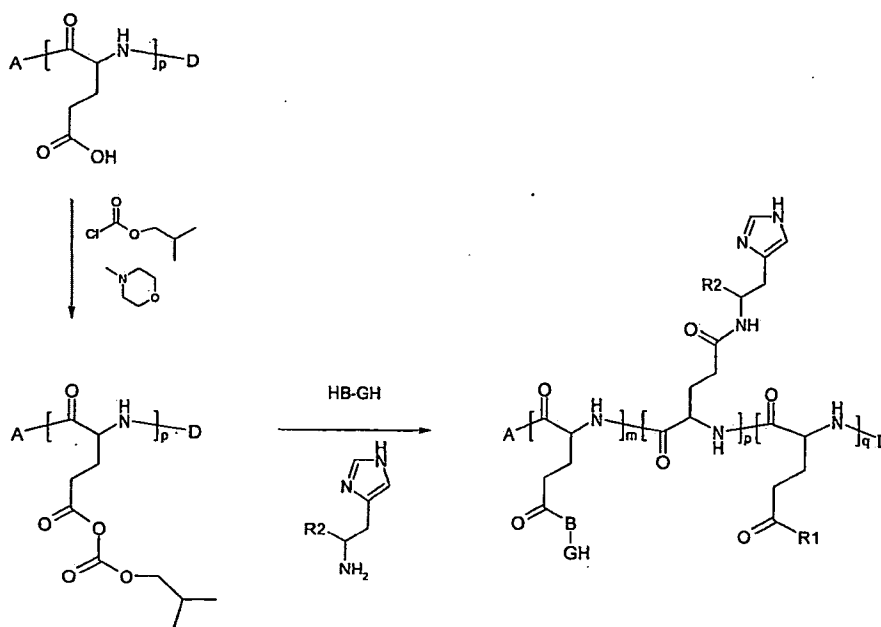
De même, le noyau imidazole du dérivé histidine est soit neutre ( $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2$ ) soit cationique  
( $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2^+$ ) selon le pH et la composition.

30 Les copolymères de l'invention sont par exemple obtenus par des méthodes connues de  
l'homme de l'art. Tout d'abord, rappelons que pour l'obtention de polyaminoacide de type  
alpha, la technique la plus courante est basée sur la polymérisation d'anhydrides de N-  
carboxy-aminoacides (NCA), décrites, par exemple, dans l'article "*Biopolymers*, 1976, 15,  
35 1869 et dans l'ouvrage de H.R. Kricheldorf "*alpha-Aminoacid-N-carboxy Anhydride and  
related Heterocycles*" Springer Verlag (1987). Le dérivé de NCA est de préférence NCA-  
Glu-O-Bz (Bz = Benzyle), car le groupement benzyle peut être sélectivement hydrolysé

sans toucher d'autres fonctions chimiques des homopolymères ou du groupement hydrophobe.

Un certain nombre de polymères utilisables selon l'invention, par exemple, de type  
 5 poly(alpha-L-glutamique), poly(alpha-D-glutamique), poly(alpha-D,L-glutamate) et  
 poly(gamma-L-glutamique) de masses variables sont disponibles commercialement.

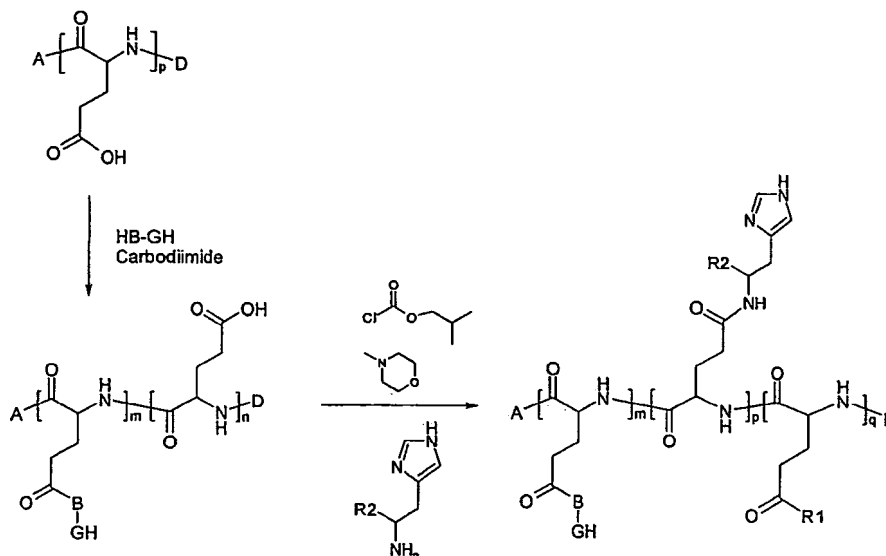
De préférence, on synthétise les copolymères de l'invention selon 2 voies. Dans la  
 première; on greffe tout d'abord simultanément ou en séquence le dérivé histidine (par  
 10 exemple l'éthyl histidine) et le groupement B-GH (par exemple la dodecylamine) sur un  
 poly(acide-L-glutamique). Cette réaction peut se faire dans un solvant tel que le DMF, le  
 DMSO ou la NMP selon le schéma suivant.



15 Dans le mécanisme ci-dessus, lorsque R1 est l'éthanol amine liée par l'amine, ce dernier est introduit au cours de la synthèse en même temps que le dérivé histidine.

Le poly(acide-L-glutamique) peut être synthétisé selon la voie décrite dans la demande de brevet FR-A-2 801 226. Dans le cas où le groupement HB-GH est lié via une fonction ester, il est plus aisé de greffer d'abord le groupement B-GH par une réaction de couplage

20 classique en utilisant un carbodiimide avant de greffer le dérivé histidine.



Dans le mécanisme ci-dessus, lorsque R1 est l'éthanol amine liée par l'amine, ce dernier est introduit au cours de la synthèse en même temps que le dérivé histidine.

- 5 La chimie de polymérisation et les réactions de couplage des groupements sont classiques et bien connues de l'homme de l'art (voir par exemples les brevets ou demandes de brevet de la demanderesse cités précédemment).

Ces méthodes seront mieux comprises à travers la description des exemples.

10

Il doit être observé que le degré de polymérisation est défini par le rapport molaire de l'initiateur sur celle du monomère.

- 15 Le couplage du greffon hydrophobe à GH avec une fonction acide du polymère est réalisé aisément par réaction du polyaminoacide en présence d'un carbodiimide comme agent de couplage et optionnellement, un catalyseur tel que le 4-diméthylaminopyridine et dans un solvant approprié tel que la diméthylformamide (DMF), la N-méthyl pyrrolidone (NMP) ou la diméthylsulfoxyde (DMSO). Le carbodiimide est par exemple, le dicyclohexylcarbodiimide ou le diisopropylcarbodiimide. Les réactifs de couplage tels que les
- 20 chloroformates peuvent également être utilisés pour la formation de liaisons amides (voir par exemple l'ouvrage de Bodanszky « Principles of Peptide Synthesis » Springer Verlag 1984 pour des exemples d'agents de couplages). Le taux de greffage est contrôlé chimiquement par la stœchiométrie des constituants et réactifs ou le temps de réaction. Les greffons hydrophobes fonctionnalisés par un acide aminé autre que celui du polymère sont
- 25 obtenus par couplage peptidique classique ou par condensation directe par catalyse acide. Ces techniques sont bien connues de l'homme de l'art.

Selon un autre de ses aspects, l'invention vise une composition pharmaceutique, cosmétique, diététique ou phytosanitaire comprenant au moins un polyglutamate tel que défini ci-dessus et éventuellement au moins un principe actif, qui peut être thérapeutique, cosmétique, diététique ou phytosanitaire.

5

Suivant une disposition intéressante de l'invention, le principe actif est associé au(x) polyaminoacide(s) modifiés par un dérivé d'histidine par une ou plusieurs liaisons autre(s) qu'une (ou que des) liaison(s) chimique(s) covalente(s).

- 10 Les techniques d'association d'un ou de plusieurs PA aux polyaminoacides modifiés selon l'invention, sont décrites notamment dans le brevet US-B-6,630,171. Elles consistent à incorporer au moins un principe actif dans le milieu liquide contenant des Particules de Vectorisation (PV), de manière à obtenir une suspension colloïdale de PV chargées en ou associées avec un ou plusieurs principe(s) actif(s) PA. Cette incorporation, qui conduit à
- 15 un piégeage de PA par les PV, peut être réalisée de la manière suivante :

- mise en solution aqueuse de PA, puis ajout des PV, soit sous forme de suspension colloïdale, soit sous forme de PV isolées (lyophilisat ou précipité) ;
  - ou ajout de PA, soit en solution, soit à l'état pur ou préformulé, à une
- 20 suspension colloïdale de particules PV, éventuellement préparée extemporanément par la dispersion de PV sèches dans un solvant approprié, tel que l'eau.

De préférence, le principe actif est une protéine, une glycoprotéine, une protéine liée à une

25 ou plusieurs chaînes polyalkylèneglycol (de préférence PolyEthylèneGlycol (PEG) : "protéine-PEGylée"), un polysaccharide, un liposaccharide, un oligonucléotide, un polynucléotide ou un peptide.

Selon une variante, le principe actif est une "petite" molécule organique hydrophobe,

30 hydrophile ou amphiphile. Au sens du présent exposé, une "petite" molécule est notamment une petite molécule non protéinique.

Comme exemples de PA susceptibles d'être associés aux polyaminoacides selon l'invention, qu'ils soient ou non sous forme de (nano ou micro)particules, on peut citer :

- 35
- les protéines telles que l'insuline, les interférons, les hormones de croissance, les interleukines, l'érythropoïétine ou les cytokines ;
  - les peptides tels que le leuprolide ou le cyclosporine ;



- les petites molécules telles que celles appartenant à la famille des anthracyclines, des taxoïdes ou des camptothécines ;
- et leurs mélanges.

5 Selon un mode de réalisation, la composition de l'invention est sous forme d'un gel, d'une solution, d'une suspension, d'une émulsion, de micelles, de nanoparticules, de microparticules, d'un implant, d'une poudre ou d'un film.

10 Suivant l'une de ses formes particulièrement préférées, la composition, chargée ou non en principe actif(s), est une suspension colloïdale stable de nanoparticules et/ou de microparticules et/ou de micelles polyaminoacides, dans une phase aqueuse.

Selon un autre mode de réalisation, la composition de l'invention est sous forme de solution dans un solvant biocompatible et peut être injectée par voie sous-cutanée,  
15 intramusculaire ou dans une tumeur.

La composition selon l'invention, dès lors qu'elle est pharmaceutique, peut être administrée par voie orale, parentérale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou buccale.

20 Il est également envisageable que la composition soit sous forme de solution dans un solvant ou un mélange de solvants biocompatibles, susceptible d'être injectée en sous-cutané, intramusculaire ou dans une tumeur.

25 Selon un autre mode de réalisation, la composition peut éventuellement contenir un excipient pour l'ajustement du pH et/ou de l'osmolarité et/ou pour améliorer la stabilité (anti-oxydants) et/ou comme agent anti-microbiens. Ces excipients sont bien connus de l'homme de l'art (se référer à l'ouvrage : *Injectable Drug Development*, P.K. Gupta et al. Interpharm Press, Denver, Colorado 1999).

30 Selon une autre variante, la composition selon l'invention est formulée de telle sorte qu'elle soit apte à former un dépôt sur le site d'injection. Le dépôt peut, par exemple, être au moins en partie provoqué par une protéine physiologique présente in-vivo.

35 Selon une autre variante, la composition selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend des polyaminoacides de formule I telle que définie ci-dessus.

De préférence, cette composition est capable de précipiter à pH physiologique.

L'invention vise aussi des compositions qui comprennent des polyaminoacides selon l'invention et des principes actifs qui sont susceptibles d'être utilisés pour la préparation :

- 5       • de médicaments, en particulier pour administration orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale ou intracérébrale, les principes actifs de ces médicaments pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des protéines liées à une ou plusieurs chaînes polyalkylèneglycol {par exemple PolyEthylèneGlycol (PEG), on parle alors de protéines "PEGylées"}, des  
10       peptides, des polysaccharides, des liposaccharides, des oligonucléotides, des polynucléotides et des petites molécules organiques hydrophobes, hydrophiles ou amphiphiles ;
- et/ou des nutriments ;
- et/ou de produits cosmétiques ou phytosanitaires.

15

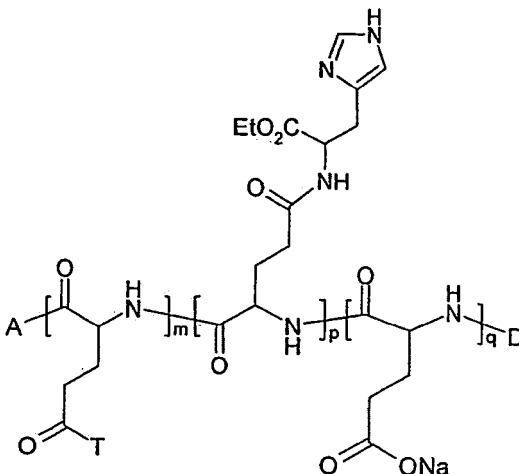
Ce procédé étant caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mettre en œuvre au moins un homopolyaminoacide tel que défini ci-dessus et/ou la composition décrite ci-dessus.

20 L'invention concerne également une méthode de traitement thérapeutique consistant essentiellement à administrer la composition telle que décrite dans le présent exposé, par voie orale, parentérale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou buccale.

25 Suivant une variante particulière de l'invention, cette méthode de traitement thérapeutique consiste essentiellement à mettre la composition telle que décrite supra sous forme de solution dans un solvant biocompatible puis à l'injecter en sous-cutané, intramusculaire ou dans une tumeur, de préférence de manière à ce qu'elle forme un dépôt sur le site d'injection.

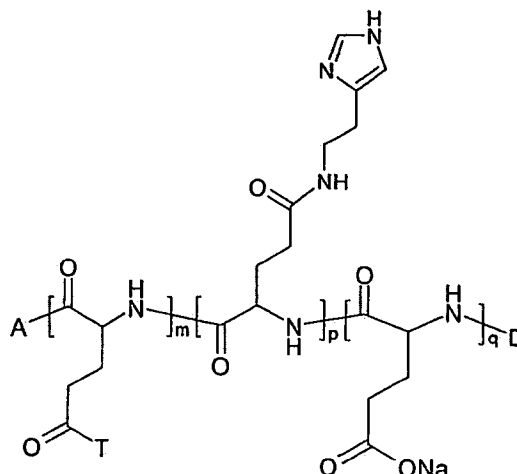
30 L'invention sera mieux comprise et ses avantages et variantes de mise en œuvre ressortiront bien des exemples qui suivent et qui décrivent la synthèse des polymères de l'invention, leur transformation en système de vectorisation de PA (suspension colloïdale aqueuse stable) et la démonstration de la capacité d'un tel système de s'associer à une protéine pour former des compositions pharmaceutiques.

35

**EXEMPLES :****Exemple 1 : synthèse du polymère (1)**

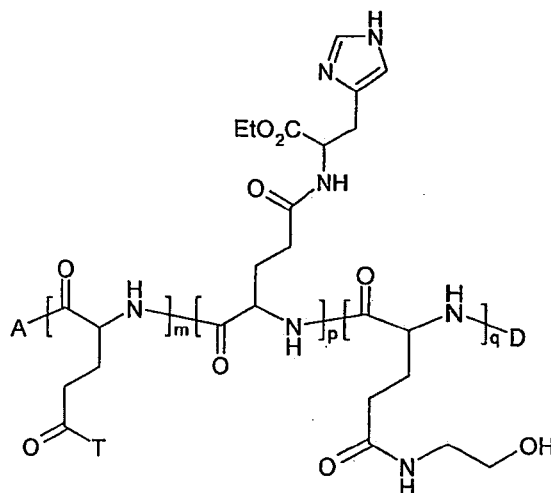
Indices et groupements :  $m = 11$ ,  $p = 150$ ,  $q = 59$ ,  $T = \text{D,L-}\alpha\text{-tocophérol (T)}$

6 g d'un poly(acide glutamique) de degré de polymérisation (DP) 220 greffé à 5% de  
 10 façon statistique avec de l' $\alpha$ -tocophérol racémique sont solubilisés par chauffage à  
 80°C dans 86 ml de DMF. A cette solution refroidie à 0°C, sont ajoutés 5,74 g d'isobutyl  
 chloroformate puis 4,26 g de N-méthyl morpholine. Le milieu réactionnel est agité 15  
 minutes en maintenant la température à 0°C. En parallèle, 20,6 g du dichlorhydrate d'ester  
 éthylique de l'histidine sont solubilisés dans 1,0 L de DMF. 22,5 ml de triéthylamine sont  
 15 ensuite ajoutés et la solution obtenue est alors chauffée à 60°C pendant une heure puis  
 refroidie à 0°C. On procède ensuite à l'ajout de la solution d'histidine à celle de polymère.  
 Le milieu réactionnel est agité 5 minutes à 0°C puis 1 heure en laissant la température  
 remonter à l'ambiante. Au bout de ce temps, le milieu réactionnel est tout d'abord quenché  
 par ajout de 10 ml d'HCl 1N puis dilué dans 2,8 L d'eau à pH 2-3. Le pH final est ajusté  
 20 à 3. La solution est ensuite concentrée à 600 ml sur un bâti de diafiltration puis lavée  
 contre 10 volumes d'eau salée (0,9% NaCl) et 5 volumes d'eau. La solution de polymère  
 est ensuite concentrée à 330 ml avec une concentration en polymère de 20 mg/ml,  
 soit 50% de rendement. Le pourcentage d'ester d'histidine déterminé sur le polymère  
 hydrolysé par RMN  $^1\text{H}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  est de 68%. Le  $M_n$  (déterminé par GPC  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$   
 25 65/5) est de 11,3 kg/mol en équivalents POE.

**Exemple 2 : synthèse du polymère (2)**

5 Indices et groupements :  $m = 11$ ,  $p = 169$ ,  $q = 40$ ,  $T = \text{D,L-}\alpha\text{-tocophérol (T)}$

3,5 g d'un poly(acide glutamique) de DP 220 greffé à 5% de façon statistique avec de l' $\alpha$ -tocophérol racémique sont solubilisés par chauffage à 80°C dans 50 ml de DMF. A cette solution refroidie à 0°C, sont ajoutés 3,35 g d'isobutyl chloroformate puis 2,48 g de N-méthyl morpholine. Le milieu réactionnel est agité 15 minutes en maintenant la température à 0°C. En parallèle, 8,6 g du dichlorhydrate d'histamine sont solubilisés dans 215 mL de DMF. 13,0 ml de triéthylamine sont ensuite ajoutés et la solution obtenue est chauffée à 40°C pendant quelques minutes puis refroidie à 0°C. On procède ensuite à l'ajout de la solution d'histamine à celle de polymère. Le milieu réactionnel est agité 5 minutes à 0°C puis 1 heure en laissant la température remonter à l'ambiante. Au bout de ce temps, le milieu réactionnel est dilué dans 800 mL d'eau à pH 2-3. Le pH final est ajusté à 3. La solution est ensuite concentrée à 500 ml sur un bâti de diafiltration puis lavée contre 10 volumes d'eau salée (0,9% NaCl) et 5 volumes d'eau. La solution de polymère est ensuite concentrée à 230 ml avec une concentration en polymère de 13,7 mg/ml, soit 49% de rendement. Le pourcentage d'histamine déterminé sur le polymère hydrolysé par RMN  $^1\text{H}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  est de 77%. Le  $M_n$  (déterminé par GPC  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$  65/35) est de 1,5 kg/mol en équivalents POE.

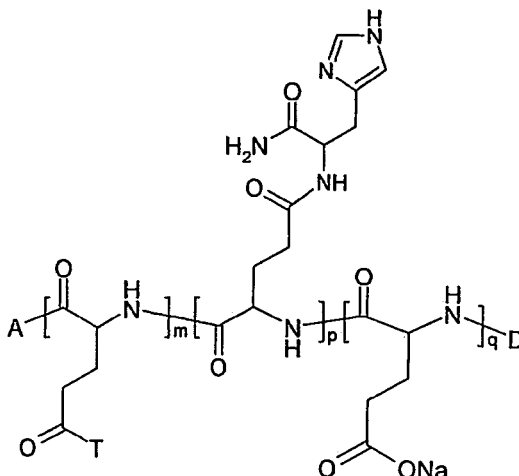
**Exemple 3 : synthèse du polymère (3)**

5

Indices et groupements :  $m = 11$ ,  $p = 88$ ,  $q = 121$ ,  $T = D,L$ -alpha-tocophérol (T)

- 5 g d'un poly(acide glutamique) de DP 220 greffé à 5% de façon statistique avec de l'alpha-tocophérol racémique sont solubilisés par chauffage à 80°C dans 63 ml de NMP.
- 10 À cette solution refroidie à 0°C, sont ajoutés 4,33 g d'isobutyl chloroformate puis 3,67 mL de N-méthyl morpholine. Le milieu réactionnel est agité 15 minutes en maintenant la température à 0°C. En parallèle, 4,28 g du dichlorhydrate d'ester éthylique de l'histidine sont solubilisés dans 43 mL de NMP. 4,66 ml de triéthylamine sont ensuite ajoutés et la solution obtenue est agitée à 20°C pendant quelques minutes puis refroidie à 0°C. On
- 15 procède ensuite à l'ajout de la solution d'histidine à celle de polymère. Le milieu réactionnel est agité 1h à 0°C puis on ajoute 4 mL d'éthanolamine et laisse la température remonter à l'ambiante. On agite le milieu réactionnel pendant 5h à 20 °C, puis il est dilué dans 420 mL d'eau à pH 2-3. La solution est ensuite diafiltrée contre 3 volumes d'eau salée (0,9% NaCl) et 8 volumes d'eau. La solution de polymère est ensuite concentrée
- 20 jusqu'à une concentration en polymère de 56 mg/g. Le pourcentage d'histidine ester éthylique greffé, déterminé sur le polymère hydrolysé par RMN  $^1\text{H}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  est de 40%, et le taux d'éthanolamine est de 55 %.

25 **Exemple 4 : synthèse du polymère (4)**



Indices et groupements :  $m = 11$ ,  $p = 209$ ,  $q = 0$ ,  $T = D,L\text{-}\alpha\text{-tocophérol (T)}$

- 5 3 g d'un poly(acide glutamique) de DP 220 greffé à 5% de façon statistique avec de l' $\alpha$ -tocophérol racémique sont solubilisés par chauffage à 80°C dans 38 ml de NMP. À cette solution refroidie à 0°C, sont ajoutés 2,74 g d'isobutyl chloroformate puis 2,2 mL de N-méthyl morpholine. Le milieu réactionnel est agité 10 minutes en maintenant la température à 0°C. En parallèle, 8,65 g du dichlorhydrate d'histidinamide sont suspendus
- 10 dans 108 mL de NMP. 10,6 ml de triéthylamine sont ensuite ajoutés et la suspension obtenue est agitée à 20°C pendant quelques minutes puis refroidie à 0°C. On procède ensuite à l'ajout de la solution de polymère activé sur la suspension d'histidinamide. Le milieu réactionnel est agité pendant 2h à 0°C, puis 1 nuit à 20 °C. On ajoute ensuite 0,62 mL d'HCl 35 %, puis 83 mL d'eau. On verse ensuite la solution obtenue dans 500 mL
- 15 d'eau à pH 3-4. La solution est ensuite diafiltrée contre 8 volumes d'eau salée (0,9% NaCl) et 4 volumes d'eau. La solution de polymère est ensuite concentrée jusqu'à un volume de 300 mL (la concentration en polymère de 18 mg/g). Le pourcentage d'histidinamide greffée, déterminé par RMN  $^1\text{H}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  est de 95 %.

## 20 Exemple comparatif 5 : le composé C1 non fonctionnalisé par un dérivé d'histidine

Le composé comparatif C1 est le précurseur (sous sa forme anionique) du polyglutamate modifié par un dérivé de l'histidine, soit le polyglutamate de DP 220 greffé à 5% de façon statistique avec de la  $\alpha$ -tocophérol racémique. Ce composé est obtenu par la méthode

25 décrite dans la demande WO-A-03/104303.

## Exemple 6 : Étude de précipitation en fonction du pH

Les résultats démontrent que les polymères de l'invention sont solubles aux pH inférieurs à environ 6 et précipitent lorsque le pH devient supérieur à 6, contrairement au composé C1.

Polymère	pH $\leq$ 5	pH $>$ 6
<b>1</b>	<b>Soluble</b>	<b>Insoluble</b>
<b>2</b>	<b>Soluble</b>	<b>Insoluble</b>
<b>3</b>	<b>Soluble</b>	<b>Insoluble</b>
<b>4</b>	<b>Soluble</b>	<b>Insoluble</b>
<b>C1</b>	Insoluble	Soluble

#### 5 Exemple 7 : Mesure de potentiel zéta

Le potentiel zéta du polymère 1 a été mesuré à deux pH auxquels celui-ci est soluble : pH 4 et pH 8 pour confirmer la nature cationique à pH acide et anionique au dessus de pH neutre. Les valeurs obtenues sont de +53 mV à pH 4 et de -37 mV à pH 8. En  
10 comparaison le polymère C1 a un potentiel zéta de -70 mV à pH neutre.

#### Exemple 8 : Stabilisation d'une protéine thérapeutique : l'hGH

Le polymère 1 est formulé avec de l'hormone de croissance humaine (hGH) dans les  
15 proportions suivantes : polymère 1 50 mg/g + hGH 5 mg/g, pH = 5.

L'hGH a un point isoélectrique de 5,4 et est, en principe, insoluble à pH 5. Or la formulation est limpide. La protéine est donc stabilisée en solution par le polymère 1.

20 Cette formulation injectée dans une solution tamponnée à pH neutre (solution de PBS) précipite.

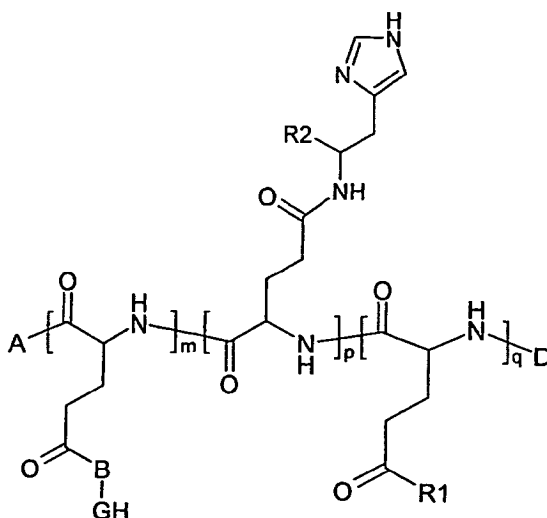
**REVENDEICATIONS**

- 5 1. Polyaminoacides comprenant des unités glutamiques, caractérisés en ce qu'au moins une partie de ces unités sont porteuses d'un dérivé de l'histidine et en ce qu'au moins une partie de ces unités sont porteuses d'un groupement hydrophobe (GH) pendant, les dérivés de l'histidine et les GH étant respectivement identiques ou différents entre eux.
- 10 2. Polyaminoacides selon la revendication.1, caractérisés en ce que pour au moins une des parties des unités glutamiques porteuses d'un dérivé de l'histidine, chaque unité de ladite partie est porteuse d'un dérivé de l'histidine, les dérivés de l'histidine étant identiques ou différents entre eux, et en ce que pour au moins une des parties des unités glutamiques porteuses d'un groupement hydrophobe (GH) pendant, chaque unité de ladite partie est porteuse d'un groupement hydrophobe (GH) pendant, les groupements GH étant identiques ou différents entre eux.
- 15 3. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que les dérivés de l'histidine sont pendants par rapport aux unités glutamiques.
- 20 4. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que les dérivés de l'histidine sont greffés aux unités glutamiques par l'intermédiaire d'une liaison amide.
- 25 5. Polyaminoacides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont constitués d'homopolymères d'alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-glutamique
- 30 6. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que les dérivés de l'histidine sont identiques ou différents entre eux et choisis parmi les groupements suivants: les esters d'histidine, de préférence l'ester méthylique et l'ester éthylique ; l'histidinol, l'histamine.
- 35 7. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que les dérivés de l'histidine sont identiques ou différents entre eux et sont choisis parmi les groupements suivants: l'histidinamide, le dérivé N-



monométhyle de l'histidinamide et le dérivé N,N'-diméthyle de l'histidinamide.

8. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils comportent en moyenne au moins 3 groupements hydrophobes (GH) par chaîne de polymère.
9. Polyaminoacides selon la revendication 8, caractérisés en ce que les groupements hydrophobes GH sont choisis dans le groupe comprenant :
- les alkyles linéaires ou ramifiés en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome,
  - les alkylaryles ou arylalkyles en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome,
  - et les (poly)cycliques en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome.
10. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'au moins l'un des groupements hydrophobes GH est obtenu par greffage, à partir d'un précurseur choisi dans le groupe comprenant: l'octanol, le dodécanol, le tétradécanol, l'héxadécanol, l'octadécanol, l'oleylalcool, le tocophérol ou le cholestérol.
11. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils répondent à l'une des formules générales (I) suivantes:



dans laquelle :

- A représente indépendamment :
  - Un groupement NHR dans laquelle R représente un H, un alkyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10 ou un benzyle,
  - Une unité acide aminé terminale liée par l'azote et dont la fonction(s) acide(s) est éventuellement modifiée par une amine ou un alcool répondant aux définitions NHR et OR respectivement.
- B est un groupement de liaison divalent, trivalent ou tétravalent, de préférence choisi parmi les radicaux suivants:  
-O-, -NH-, -N-alkyle- (C1 à C5), un résidu d'acide aminé (de préférence naturel), un diol, un triol, une diamine, une triamine, un aminoalcool ou un hydroxyacide comportant de 1 à 6 atomes de carbone,
- D représente un H, un groupe acyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, ou un pyroglutamate;
- Les groupements hydrophobes GH représentent chacun indépendamment les uns des autres un radical choisi parmi:
  - Les alkyles linéaires ou ramifiés en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S), ou
  - Les alkylaryles ou arylalkyle en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S), ou
  - Les (poly)cycliques en C8 à C30 pouvant comporter éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S);
- R1 représente l'éthanol amine liée par l'amine, un radical OX, dans lequel X représente un H ou une entité cationique, de préférence sélectionnée dans le groupe comprenant :
  - les cations métalliques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant : le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium ;
  - les cations organiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant :
    - les cations à base d'amine,
    - les cations à base d'oligoamine,
    - les cations à base de polyamine (la polyéthylèneimine étant particulièrement préférée),

- les cations à base d'acide(s) aminé(s) avantageusement choisis dans la classe comprenant les cations à base de lysine ou d'arginine,
  - ou les polyaminoacides cationiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant la polylysine ou l'oligolysine;
  - R2 représente un ester d'alkyl, d'éthyle de préférence, un ester de BGH, un groupe  $\text{CH}_2\text{OH}$  (histidinol), H (histamine), un groupe  $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$  (histidinamide),  $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$  ou  $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ .
  - m, p et q sont des entiers positifs;
  - $(m)/(m+p+q)$  est défini comme le taux de greffage molaire des groupements hydrophobes GH et varie de 1 à 50 % molaire sous condition que chaque chaîne de copolymère possède en moyenne au moins 3 greffons hydrophobes;
  - $(p)/(m+p+q)$  est défini comme le taux de greffage molaire des groupements histidines et varie de 1 à 99 % molaire.
  - $(m+p+q)$  varie de 10 à 1000, de préférence entre 30 et 500;
  - $(q)/(m+p+q)$  varie de 0 à 98 % molaire.
12. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que les groupements hydrophobes GH sont disposés de façon aléatoire.
13. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que leur masse molaire se situe entre 2.000 et 200.000 g/mole, et de préférence entre 5.000 et 100.000 g/mole.
14. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils sont porteurs d'au moins un greffon de type polyalkylène (de préférence éthylène)glycol lié à une unité glutamate.
15. Composition pharmaceutique, cosmétique, diététique ou phytosanitaire comprenant au moins un polyglutamate modifié par un dérivé d'histidine selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.
16. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un principe actif.

17. Composition, notamment selon la revendication 16, caractérisée en ce que le principe actif est associé au(x) polyglutamate(s) modifié(s) par un dérivé d'histidine par une ou plusieurs liaisons autre(s) qu'une (ou des) liaison(s) chimique(s) covalente(s).
- 5
18. Composition selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce que le principe actif est une protéine, une glycoprotéine, une protéine liée à une ou plusieurs chaînes polyalkylèneglycol, un polysaccharide, un liposaccharide, un oligonucléotide, un polynucléotide ou un peptide.
- 10
19. Composition selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce que le principe actif est une petite molécule organique hydrophobe, hydrophile ou amphiphile.
- 15
20. Composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, caractérisée en ce qu'elle peut être administrée par voie orale, parentérale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou buccale.
- 20
21. Composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 20, caractérisée en ce qu'elle est sous forme d'un gel, d'une solution, d'une émulsion, de micelles, de nanoparticules, de microparticules, d'une poudre ou d'un film.
- 25
22. Composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 21, caractérisée en ce qu'elle est une suspension colloïdale de nanoparticules et/ou de microparticules et/ou de micelles de polyglutamate modifié par un dérivé d'histidine, dans une phase aqueuse.
- 30
23. Composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 22, caractérisée en ce qu'elle est sous forme de solution dans un solvant biocompatible et en ce qu'elle peut être injectée par voie sous-cutanée, intramusculaire ou dans une tumeur.
- 35
24. Composition selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle est apte à former un dépôt sur le site d'injection.
25. Composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 24, caractérisée en ce qu'elle comprend des polyaminoacides selon la revendication 11.

26. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle est capable de précipiter à pH physiologique.
27. Procédé de préparation de médicaments, en particulier pour administration orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale ou intracérébrale, les principes actifs de ces médicaments pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des protéines liées à une ou plusieurs chaînes polyalkylèneglycol, des peptides, des polysaccharides, des liposaccharides, des oligonucléotides, des polynucléotides et des petites molécules organiques hydrophobes, hydrophiles ou amphiphiles ; et/ou des nutriments ; et/ou de produits cosmétiques ou phytosanitaires ; caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mettre en œuvre au moins l'un des polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 et/ou la composition selon l'une quelconque des revendications 15 à 26.